

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570215

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるリボソーム構成因子群の転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Nobel regulatory mechanism for transcription of genes encoding ribosomal components in *S. cerevisiae*

研究代表者

笠原 浩司 (Kasahara, Koji)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40304159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では出芽酵母において異なる転写系によって転写されるリボソームタンパク質遺伝子、及びrRNA遺伝子に結合し、これらの協調的な転写制御に関わると考えられているHmo1の働きについて研究を行った。各種HMO1変異株、及び変異型タンパク質を用いた解析から、Hmo1は二つのHMG boxモチーフのうち、従来役割が不明であったbox Aを介して多量体を形成することでDNAに結合すること、そしてPPIaseタンパク質をコードするFPR1遺伝子とHMO1の二重破壊株が著しい生育遅延を示すという知見に基づき、両者がPol IIによるrRNAの転写開始段階において協調的に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a research for the function of Hmo1 protein, a member of HMGB family proteins in *S. cerevisiae*. Hmo1 binds to the 35S ribosomal RNA gene and ribosomal protein gene promoters, which are transcribed by Pol I and Pol II, respectively, and regulates transcription of these genes cooperatively in response to environmental conditions. From analyses using various HMO1 mutant strains and proteins, we elucidated that Hmo1 dimerizes (or multimerizes) through box A, of which function has been unknown, and binds to target DNA in this form. In addition, based on the observation that deletion of HMO1 gene, in combination with deletion of FPR1 gene that encodes one of PPIase (peptidylprolyl isomerase) in *S. cerevisiae*, causes severe growth defect, we conducted genetic analyses to clarify the cause of a growth defect of this double disruptant. As the result, we revealed that these proteins work cooperatively at the step of initiation in transcription of rRNA by Pol I.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写・転写調節

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(以下代表者)が基本転写因子 TFIIID の結合タンパク質として同定した Hmo1 は、35S リボソーム RNA (以下 rRNA; Ribosomal RNA) 遺伝子のプロモーターとコーディング領域全体、及び約 70% のリボソームタンパク質遺伝子(以下 RPG; Ribosomal Protein Gene) のプロモーターに特異的に結合し、*HMO1* 遺伝子の欠失によりこれら標的遺伝子の転写が低下することから、Hmo1 はリボソーム構成因子の協調的な生合成の制御に重要な因子であると考えられていた。研究開始当初までの代表者の研究から、Hmo1 は RPG プロモーター (RNA ポリメラーゼ II によって転写される) に結合し、足場となって他の転写因子 Fhl1 の結合を促進することにより転写を活性化することが明らかにされた。さらに、*HMO1* 遺伝子破壊株 (以後 *hmo1* 株) において RPG の転写開始点が上流側にシフトするという知見を元に、その原因解明を通して Hmo1 が、それと排他的に RPG プロモーターに結合したヌクレオソームとともに、転写開始前複合体 (以下 PIC; Pre-Initiation Complex) が結合しうる領域をコアプロモーター内に限定することにより、生理的に正しい位置からの転写開始を促進するという、それまでにない新たな転写開始位置決定の機構を提唱した。

一方、Hmo1 のもう一つの主要な標的遺伝子である 35S rRNA 遺伝子 (RNA ポリメラーゼ I によって転写される) については研究開始当初までに、100~200 コピーが繰り返して存在する 35S rRNA 遺伝子のうち、活発に転写されている約半数のコピーには Hmo1 が、転写されていない半数にはヌクレオソームが、互いに排他的に結合していることが他の研究グループによって明らかにされていた。加えて、これら Hmo1 の標的遺伝子への結合は、栄養飢餓をミミックし、リボソーム構成因子の遺伝子の転写全般を抑制する薬剤ラパマイシンの添加によって速やかに失われることが報告されており、Hmo1 の標的遺伝子への結合の制御が環境に応じたこれらの遺伝子群の転写の

ON/OFF に重要な役割を果たすものと認識されるようになりつつあった。

上記の様に、Hmo1 の標的遺伝子、及び RPG プロモーターにおける Hmo1 の機能やその重要性については一部明らかにはされていたものの、一般的に DNA 結合における配列特異性の低い HMG ボックスを DNA 結合モチーフとして持つ Hmo1 が、*in vivo* において標的遺伝子へ特異的に結合する仕組みや、環境に応じてその結合が制御される仕組みなどについては、当時ほとんど明らかにされておらず、さらに Hmo1 の 35S rRNA 遺伝子上における役割については多くが不明であった。

2. 研究の目的

代表者は本研究開始以前、主に *HMO1* 遺伝子破壊が引き起こす転写異常を解析することにより、Hmo1 自身の果たす役割について多くのことを明らかにしてきたが、その一方 Hmo1 の働きを制御する、あるいは Hmo1 と関連して働く仕組みや因子についてはほとんど不明であり、それを明らかにすることは、リボソーム生合成の包括的な理解に極めて重要であると考えた。そこで本研究では、Hmo1 の標的遺伝子への結合の仕組み、及びそれに関わる因子の解明、そして rRNA 遺伝子上における Hmo1 の役割の解明を目的とし、具体的に以下の項目を明らかにすることを目標とした。

(1) Hmo1 の標的である RPG プロモーターへの結合、及びそこでの機能を制御する仕組みや因子を明らかにすることにより、RPG の転写制御についてのより詳細、かつ包括的な理解を目指す。

(2) rRNA 遺伝子における Hmo1 の役割を明らかにするため、高分解能 ChIP 解析により rRNA 遺伝子上における Hmo1、その他の因子群の結合位置、*HMO1* 欠失による他の因子の結合の変化、それに伴って起こる転写異常などについて、研究開始当時 RPG について解明されていたのと同程度まで、分子レベルで詳細に理解することを目指す。

(3) これまで主に *in vivo* の解析で明らかに

なった Hmo1 の機能、及び項目(1)で明らかになると期待される因子/仕組みを *in vitro* で検証できる系を構築し、それを用いて RPG の転写制御についてより正確な理解を目指す。

3. 研究の方法

本研究では主に上記の目的に挙げた項目のうち、(1), (2)について以下の様な方法で行った。(それぞれについて以下に(1), (2)として記載する)

(1) RPG プロモーターにおける低ヌクレオソーム領域 (以下 NFR; Nucleosome Free Region)の形成機構や、Hmo1 の NFR への結合機構の解明、及び Hmo1 と協調的に働く因子の同定を、主に遺伝学的な手法を駆使した解析により行うこととした。Hmo1 の主要な標的遺伝子である *RPS5* プロモーターにおいては、Hmo1 の欠失により、本来の転写開始点 (ATG より -36 bp 上流)からの転写が減少し、本来 Hmo1 の結合によって転写開始が抑制されている NFR 内に強い転写開始点 (同-215 bp)が生じることが明らかになっていた。そこで *RPS5* プロモーターにレポーター遺伝子として翻訳開始コドンを欠失させた *HIS3* 遺伝子を融合し、さらに本来の転写開始点 (-36 bp)の上流 (-156 bp)に人工的に翻訳開始コドンを挿入した(図1)。このレポーター遺伝子を酵母株に形質転換したところ、野生株では機能的な His3 タンパク質が翻訳されず、ヒスチジンを欠いた培地で生育不能であるのに対し、*hmo1* 株では転写開始点が上流にシフトし (-215 bp の位置)、その結果、新たに挿入した ATG (-156 bp)から His3 の翻訳が十分に起こり、同培地で生育が可能となった。そこで、

本レポーターを用いて Hmo1 の標的プロモーターへの結合に欠損を持つ変異株の探索を行うこととした。また、本レポーターを用いて、Hmo1 の二つの HMG ボックスのうち、DNA 結合における役割の不明であった box A に PCR を用いてランダムに変異を導入し、DNA 結合能に欠損を持つ変異体の取得を行い、それらを用いて box A の機能の解明を目指した。

(2) Hmo1 の役割を解明するためのアプローチの一つとして、*HMO1* 遺伝子破壊と合成致死となる変異の遺伝学的探索を行い、その結果、過去にそのような知見が報告されていた *FPR1* 遺伝子の変異を再発見した。*HMO1* と *FPR1* の両方の遺伝子を破壊した二重破壊株を作成した所、この株は過去の報告に反して致死では無かったものの、生育に著しい遅延を示し、両遺伝子産物が細胞の生育にとって重要な役割を共有することが強く示唆された。このため、この株の生育遅延の原因を突き止めることが共にその真の役割が明らかにされていない両タンパク質の機能を解明する上で有効なアプローチであると考えた。そのための方法として、二重破壊株の転写異常を網羅的、あるいは個別に解析することにより、両者の標的遺伝子についての手がかりを得る、両者の標的候補である rRNA 遺伝子の転写やその関連因子の DNA への結合を ChIP 法により解析し、rRNA 転写における具体的な役割について手がかりを得る、二重破壊株の生育を回復させる変異株の単離を行い、その変異点の特定と生育回復の機序の解明する、ことを目指し研究を行った。

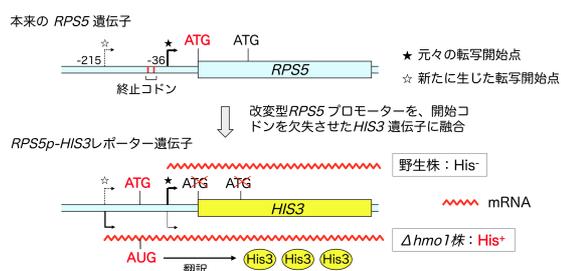


図 1

4. 研究成果

本研究では主に上記の目的、及び方法に挙げた項目のうち、主に(1), (2)について研究を行い、以下の様な成果を得た。

(1) Hmo1 の主要な標的である *RPS5* 遺伝子プロモーターへの Hmo1 の結合に欠損を持つ変異株の探索を、上記のレポーター遺伝子を用いて行った。野生型の酵母株に対しエチルメタンスル

ホン酸を用いて変異処理を行った後、これに上記のレポーター遺伝子を含むプラスミドを形質転換し、ヒスチジンを欠いた培地上で生育できる変異株コロニーを単離した。これらの株が His⁺形質の原因となった変異を、ゲノムライブラリーからの探索、あるいは全ゲノムシーケンス解析により同定した。その結果、*HMO1* 遺伝子自身の変異 (T30R, P109L, S117F, A118V, W148stop) に加え、*sui1* (A63T, G66S), *sui3* (L254Q), *cbf2* (M24I, G303E, M609I) などの遺伝子の変異を同定した。これらの株について、レポーター遺伝子の転写開始点を調べたところ、*hmo1* 変異株では野生株に比べ新たな転写開始点が多数生じていた。一方、その他の変異株でも野生株に比べ若干の転写開始点の変化が観察された。現時点で *hmo1* 変異株以外の株での転写開始点の変化の機序、及びこの変化が His⁺形質の原因となっているかは不明である。*Cbf2* は染色体の分配に必要なセントロメアに結合するタンパク質であるが、RPG プロモーターへの結合は観察されなかった。しかし、代表者らは以前、免疫沈降実験により *in vivo* における *Cbf2* と *Hmo1* の相互作用を見出しており、*cbf2* 変異により *Hmo1* のプロモーターへの結合に変化が生じている可能性は十分に考えられ、解析を継続中である。一方、*Sui1*, *Sui3* は翻訳の開始コドンの認識に関わる因子であり、これらの変異株は転写開始点の変化ではなく、ATG 以外のコドンから翻訳が開始したことで His⁺の形質を獲得したのではないかと考えられる。

このように本探索の結果、*hmo1* を含め同じ遺伝子の変異が複数種類得られていることは、本探索系が有効で、かつスクリーニングのサイズも十分であると考えられ、このことは *Hmo1* の RPG プロモーターへの特異的結合には他の因子の寄与は少なく、*Hmo1* が自律的に標的遺伝子に結合することを示唆している。

Hmo1 の変異は大部分が二つの HMG box のうち box B に生じたものであり、box B が DNA に直接結合するという従来の知見に沿うものであった。一方、興味深いことに変異の一つ

(T30R) はこれまで DNA 結合への関与が不明であった box A 内に見いだされ、ChIP アッセイの結果、この変異体は DNA 結合をほぼ失っていた。さらに、box A に PCR を用いてランダムに新たに変異を導入し、上記のレポーター遺伝子を用いた探索を行った結果、DNA 結合に欠損を持つ変異が多数取得され (K13E, V17A, S18P, E22K, K25E, A31V, V35A, F37S)、box A の DNA 結合における重要性が確かめられた。

box A の DNA 結合における役割について各種の解析を行ったところ、*Hmo1* は box A を介して多量体 (もしくは二量体) を形成し、box A 内に変異を持つ *Hmo1* 変異体の多くは、この多量体形成能を失っていた。また box A を欠失させ、代わりに box B を挿入した (box B を二つ持つ) 変異体は DNA 結合能を回復していたことから、*Hmo1* は box A を介して多量体を形成し、複数の box B を介して標的 DNA へと安定に結合することが強く示唆された。

(2) *HMO1* 遺伝子破壊株 (*hmo1*) と合成致死性を示す変異株の探索を、*hmo1 ade2 ade3* 変異株を用いたコロニーセクターリングアッセイにより行った。その結果、過去に *hmo1* と合成致死となることが報告されていた *FPR1* 遺伝子の変異株を再同定した。両遺伝子の二重破壊株を作成した結果、実際にはこの株は致死ではなかったものの、野生株、及び両遺伝子の単独破壊株に比べ著しい生育の遅延を示した。これらの株を用いて次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行い、全ゲノムレベルでの遺伝子発現解析を行ったところ、*hmo1* 株では予想通りリボソームタンパク質遺伝子の発現が低下していたのに加え、DNA 複製ストレス応答遺伝子や糖の取り込みや代謝に関わる遺伝子の発現が有意に低下していることが新たに明らかになった。しかし、*hmo1 fpr1* 二重破壊株は *hmo1* 株に比べ、(タンパク質をコードする遺伝子に関しては) 顕著な遺伝子発現の変化は見られなかった。一方、上記の株についてノザンプロットングによる個別遺伝子の転写量の解析を行ったところ、二重破壊株では *Pol II*, *Pol III* によ

って転写される他のリボソーム構成因子の遺伝子に比べ、Pol I によって転写される rRNA の量が大きく低下することが見いだされ、本株は Pol I による転写に欠損があることが示唆された。Pol I の 35S rRNA 遺伝子への結合を ChIP 法にて解析した結果、二重破壊株では Pol I のプロモーター領域への結合が大きく低下する一方、その結合が下流においてさらに低下するということが観察されなかった。このことは二重破壊株では Pol I による転写の伸長段階よりも、開始段階において何らかの異常があることを示唆している。そこで、Pol I による 35S rRNA の開始に働く基本転写群 Uaf, Core factor, Rrn3 のプロモーター領域への結合を ChIP 法により調べた。その結果、Uaf に比べ他の因子の結合が二重破壊株で有意に低下していた。このことは二重破壊株では最初にプロモーターの上流領域に結合した Uaf を足場に他の因子が重合し、転写開始複合体を形成する過程に異常があることを示唆している。

一方、*hmo1 fpr1* 二重破壊株の生育異常の原因解明のためのもう一つのアプローチとして、代表者は遺伝学的な解析手法を駆使した探索を行った。この二重破壊株は生育が極めて遅いが、比較的高頻度に生育が *hmo1* 単独破壊株並に回復した変異株を生じるという性質を持つ。このサプレッサー変異株の一つを生育の悪い元の二重破壊株と掛け合わせた二倍体は良好な生育を示したことからサプレッサー変異が優性であることが明らかとなり、さらに四分子解析を行った結果、生育の良い株と悪い株が 2:2 に分離したことから、サプレッサー変異株の生育の回復が染色体上の一カ所に起こった変化に起因することが強く示唆された。さらにこのサプレッサー変異株では rRNA の転写も *hmo1* 株並に回復していることが明らかになった。このサプレッサー変異株の変異点の特定を目指し、全ゲノムシーケンズ解析を行った結果、この株では三番染色体の末端を大きく欠いていることが明らかとなった。この形質は優性であるため、特

定の遺伝子の機能が失われたことが原因ではなく、染色体末端の欠失という異常に起因する何らかの遺伝子発現の変化が生育回復の原因であると考え、RNA-seq による解析を行っている。さらに独立に得られた他のサプレッサー変異株についても、現在変異点の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hmo1 directs preinitiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region.

Kasahara K., Ohyama Y., and Kokubo T., *Nucleic Acids Res.* 39(10): 4136-4150 (査読有)(2011)

Novel regulatory mechanisms for transcriptional initiation of ribosomal protein genes in *S. cerevisiae*. (総説)

Kasahara K., *Seikagaku* 83(8):736-42 (査読有)(2011)

[学会発表](計 3 件)

ラッカセイ種皮ポリフェノールの *Bacillus cereus* に対する抗菌作用の検証
小澤恵実、田村倫子、田中尚人、矢口行雄、笠原浩司、村清司、荒井綜一、2013 年日本農芸化学会年次大会 (3/24-3/28、仙台)

リボソーム構成因子の発現調節に関わる酵母 Hmo1 タンパク質の DNA 結合機構
東野綺子、雲財悟、中山理紗、土屋奈穂、吉川博文、古久保哲朗、笠原浩司、2013 年日本分子生物学会年会 (12/3-12/6、神戸)

出芽酵母リボソームタンパク質遺伝子の新規転写制御機構
笠原浩司、大山良文、古久保哲朗、2011 年日本分子生物学会年会 (12/13-12/16、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 浩司 (Kasahara Koji)

東京農業大学応用生物科学部・准教授

研究者番号：40304159